

# METHOD FOR SEPARATING/RECOVERING POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID FROM BIOLOGICAL CELL

Patent Number: JP2002306190  
 Publication date: 2002-10-22  
 Inventor(s): IMAMURA TAKESHI; KENMOKU TAKASHI; SUZUKI TOMOHIRO; HONMA TSUTOMU; NOMOTO TAKESHI; SUGAWA ETSUKO; YANO TETSUYA  
 Applicant(s): CANON INC  
 Requested Patent: ☒ JP2002306190  
 Application Number: JP20010111273 20010410  
 Priority Number (s):  
 IPC Classification: C12P7/62  
 EC Classification:  
 Equivalents:

## Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for recovering a poly-3-hydroxyalkanoic acid(PHA), capable of making a separation procedure simple, capable of effectively removing cell-forming components other than the PHA from the biological cells containing the PHA through a process of few steps at a low cost, and capable of obtaining the highly purified PHA in a high yield without having such a fear that chemicals including enzymes, acids, and alkalis may remain in the PHA.

**SOLUTION:** This method for recovering the PHA from the biological cells includes the following processes: a process for crushing the biological cells containing the PHA to give a crushed product; another process for separating the crushed product into a water-soluble fraction and a water-insoluble fraction; and the other process for treating the water-insoluble fraction with an oxidizing agent.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-306190

(P2002-306190A)

(43) 公開日 平成14年10月22日(2002.10.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト*(参考)
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 7/62		C 1 2 R 1:00	
C 1 2 R 1:00)		1:38	
(C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:38)			

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2001-111273(P2001-111273)

(22) 出願日 平成13年4月10日(2001.4.10)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72) 発明者 見目 敬

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離・回収方法

(57) 【要約】

【課題】 分離操作を簡素化し、少ない工程数で安価に PHA 含有生体細胞から PHA 以外の細胞構成成分を効率よく除き、かつ酵素、酸、アルカリ等の薬品の残留のおそれがない純度の高い PHA を高収率で得るための PHA の回収方法を提供する。

【解決手段】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞を破砕して破砕物を得る工程と、該破砕物を水溶性画分と水不溶性画分とに分離する工程と、該水不溶性画分を酸化剤で処理する工程とを含むことを特徴とする生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法において、  
ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞を破碎して破碎物を得る工程と、  
該破碎物を水溶性画分と水不溶性画分とに分離する工程と、  
該水不溶性画分を酸化剤で処理する工程とを含むことを特徴とする生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法。

【請求項 2】 該生体細胞を破碎する工程を超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩擦法、撹拌法、凍結融解法のいずれかの方法で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 該酸化剤が過酸化化合物である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 該過酸化化合物が、過酸化水素、過炭酸ナトリウムのいずれかである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 該酸化剤中の該過酸化水素の濃度が 3.0% から 31.0% の範囲である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 該酸化剤中の該過炭酸ナトリウムの濃度が 5.0% から 20.0% の範囲である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】 該酸化剤で処理する処理温度が 80℃ から 100℃ の範囲である請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 該酸化剤が次亜塩素酸ナトリウムである請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】 該酸化剤中の該次亜塩素酸ナトリウムの濃度が 4% (有効塩素濃度約 1.7%) から 6% (有効塩素濃度約 2.5%) である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 次亜塩素酸ナトリウムで処理する処理温度が 0℃ から 10℃ である請求項 9 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞から、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を回収する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)に代表される微生物産生ポリエステル(ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸；以下 PHA と記載)は、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうするという特性を有している。人類は長年にわたって合成高分子をプラスチック等として使用してきたが、それらのプラスチックが廃棄物となった場合、その分解されにくいという性質が災いし、廃棄物処理場に蓄積される。また、焼却処理を行なうことにより、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の原因となり、環境汚染を引き起こすことが問題

となっている。一方、微生物産生 PHA は生分解されることにより自然の物質循環に取り込まれるので、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。また、医療用軟質部材としても今後有用視される可能性を有している(特開平 5-159 号公報)。

【0003】 これまで、多くの細菌が PHB 或いはその他のヒドロキシアルカン酸とのコポリマーを菌体内に生成・蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」(生分解性プラスチック研究会編；(株)エヌ・ディー・エス)、p178-197)。特に、アルカリゲネス・ユウトロファス H16 (*Alcaligenes eutrophus* H16, ATCC No.17699) 及びその変異株はこれらポリマーの生産に関し詳細に研究されてきており、基質となる炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と 3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)の共重合体または両者の各単位を共に含有成分とする共重合体を様々な割合で生成することが開示されている(特公平 6-15604 号公報、特公平 7-14352 号公報、特公平 8-19227 号公報等)。

【0004】 特許公報第 2642937 号には、シュードモナス・オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347 株に、炭素源として非環状脂肪酸炭化水素を与えることにより、炭素数が 6 から 12 までの 3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)をモノマーユニットとするポリエステルを生産することが開示されている。

【0005】 特開平 5-74492 号公報には、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属、パラコッカス(*Paracoccus*)属、アルカリゲネス属、シュードモナス属のバクテリアを、炭素数 3 から 7 の第一アルコールに接触させることにより 3HB と 3HV の共重合ポリエステルを生産せしめる方法が開示されている。

【0006】 特開平 5-93049 号公報、及び特開平 7-265065 号公報には、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas Caviae*)がオレイン酸やオリーブオイルを炭素源として培養することにより 3HB と 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)の 2 成分共重合ポリエステルを生産することが開示されている。

【0007】 特開平 9-191893 号公報には、コマモナス・アシドボランス(*Comamonas acidovorans*) IFO 13852 株が、炭素源としてグルコン酸及び 1,4 ブタンジオールを用いた培養により、3HB と 4-ヒドロキシ酪酸(4HB)をモノマーユニットに持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0008】 この様な、微生物により生産・蓄積された PHA は、通常 PHA が溶解する有機溶剤、具体的にはクロロホルムやジクロロメタン等の塩素系有機溶剤で菌体から抽出する方法が一般的である。しかし、大規模生産を考えた場合、微生物菌体より PHA を分離するためには、上記の方法では大量に塩素系有機溶剤を使用することとなり、現実的ではない。

【0009】この様な観点から、微生物菌体等の生体細胞からPHAを分離する際に、有機溶剤を使用しない方法が様々に研究されてきている。

【0010】特開昭57-174094号公報には、PHA蓄積菌体を加温加圧し、圧力を開放することにより菌体を破碎して微生物菌体からPHAを分離する方法が開示されている。

【0011】米国特許4562245号公報及び特開昭59-205992号公報には、PHB含有菌体をタンパク質分解酵素組成物で細胞を消化し、PHBを分離する方法が開示されている。

【0012】米国特許4910145号公報及び特開昭60-145097号公報には、タンパク質分解酵素や界面活性剤等の細胞成分可溶化剤をもちいてPHBを菌体から分離する方法が開示されている。

【0013】特開昭63-226291号公報には、菌体をスフェロブラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破碎し、そして遠心分離したのちに形成される最上層のPHAを分離する方法が記載されている。

【0014】特開平5-336982号公報には、PHA蓄積微生物の細胞質をプロテアーゼで溶解させ、界面活性剤を用いて当該重合体及び/又は共重合体を精製する方法が開示されている。

【0015】特開平7-31487号公報、特開平7-31488号公報、特開平7-31489号公報には、PHB含有菌体をアルカリで処理し、PHBを分離する方法、高温高圧処理し、PHBを分離する方法、両者を組み合わせてPHBを分離する方法が開示されている。

【0016】特表平8-508881号公報には、PHA蓄積菌体をタンパク質分解酵素処理した後、適当なキレート剤で処理し、更に過酸化水素処理を行なうことでPHAを菌体から分離する方法が開示されている。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記の処理では、操作が煩雑であること、酵素や酸、アルカリを使用し残留の恐れがあること等から、更に簡便で純度の高いPHAを回収し得る方法が求められていた。

【0018】本発明の目的は、従来技術における上記のような課題を解決し、少ない工程数で安価にPHA含有生体細胞からPHA以外の細胞構成成分を効率よく除き、かつ純度の高いPHAを高収率で得るためのPHAの回収方法を提供することにある。

【0019】なお、本発明における「生体細胞」とは、微生物細胞のみならず、PHA合成遺伝子を組み込むことによりPHAの生産が可能となった植物細胞等の高等生物の細胞も含んでいる。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、少ない工程数で安価にPHA含有生体細胞からPHA以外の細胞構成成分を効率よく除き、かつ純度の高いPHAを

高収率で得るためのPHAの回収方法に関して鋭意検討を行った結果、以下のような発明に至った。

【0021】即ち本発明は、生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法において、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞を破碎して破碎物を得る工程と、該破碎物を水溶性画分と水不溶性画分とに分離する工程と、該水不溶性画分を酸化剤で処理する工程とを含むことを特徴とする生体細胞からのポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の回収方法に関するものである。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明における、生体細胞を破碎する工程では、超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩砕法、擂潰法(ガラス粉末やアルミナ粉末等の助剤を加えて乳鉢中ですり潰す方法)、凍結融解法等の薬剤を使用しない方法を用いることが望ましい。更に再懸濁液を遠心分離等の方法により固体成分と可溶成分を分離し、PHA成分が含まれている固体成分を過酸化化合物で処理する。

【0023】本発明の方法で用いられる酸化剤は、過酸化化合物或いは次亜塩素酸ナトリウムである。

【0024】本発明の方法で用いる過酸化化合物は、過酸化水素、過安息香酸・メタクロロ過安息香酸・過ギ酸・過酢酸・モノペルオキシフタル酸・トリフルオロ過酢酸等の有機過酸類やそのエステル類が挙げられるが、水溶液として容易に用いることができること、反応が比較的穏やかであること等から、過酸化水素、過炭酸ナトリウムのいずれかを用いることが望ましい。過酸化水素は処理後の残留物が無く回収されたPHAの純度を高める面から非常に有効であるが、PHAのユニット構造によっては酸化を受け構造が変化してしまう可能性がある場合にはより温和な反応が進行する過炭酸ナトリウムを用いることが望ましい。

【0025】本発明の方法で用いる過酸化水素の濃度は3.0%から31.0%の範囲であることが望ましく、過炭酸ナトリウムの濃度は5.0%から20.0%の範囲であることが望ましい。

【0026】これら過酸化化合物の処理温度は80℃から100℃の範囲であることが望ましく、それ以下であると効果が薄く回収物の純度が低くなり、それ以上であると構造が変化する恐れがある。また、反応時間は30分から2時間、更に望ましくは1時間程度が望ましい。

【0027】また、処理後は水によって洗浄を行い、2度程度攪拌、遠心分離を繰り返す必要がある。残留微量金属が望ましくない場合には水は脱イオン水、蒸留水、純水等の精製水を用いることが望ましい。過酸化化合物として過炭酸ナトリウムを用いた場合には過炭酸ナトリウムが残留しないように注意が必要である。遠心分離を行う場合特に注意が必要なのは温度であり、0℃から10℃程度、好ましくは0℃から5℃で行うことが望ましい。

【0028】本発明の方法で用いる次亜塩素酸ナトリウムの濃度は4%(有効塩素濃度約1.7%)から6%(有効塩素濃度約2.5%)程度が望ましく、処理温度は0℃から10℃であることが望ましい。この場合も過酸化化合物を用いた場合と同様、処理後は水によって洗浄を行い、2度程度攪拌、遠心分離を繰り返す必要がある。

【0029】特に高純度のPHAを得る必要があるときには、PHAの分離および洗浄操作の後に、例えば酵素、酸化剤、界面活性剤またはこれらを組み合わせた化学的処理等を行うこともできる。

【0030】本発明の方法を用いることができる生体細胞は、体内にPHAを蓄積する生体細胞であればいかなる生体細胞でもよく、主には微生物菌体、更にはPHA生産遺伝子を組み換えた植物細胞等にも応用することができる。

【0031】次に本発明を実施例によって更に詳しく説明する。

【0032】各実施例で用いたM9培地は下記の組成を有するものである。

M9培地組成(1リットル中):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.2 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g  
NaCl 0.5 g  
NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g  
水 残部

(pH 7.0)

本実施例で用いた微生物はラルストニア・ユウトロファ TB64株(Ralstonia eutropha TB64、特開2000-166587号公報に開示; 経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託(寄託番号:FERM BP-6933))、及びシュードモナス・オレオボランス(Pseudomonas oleovorans)ATCC 29347(American Type Culture Collectionより分譲)である。

【0033】

【実施例】[実施例1]リンゴ酸ナトリウム0.1%を含有するM9寒天培地上のTB64株のコロニーを、500mL容振とうフラスコ中の、リンゴ酸ナトリウム0.5%を含有するM9培地50mLに接種し、30℃で振とう培養した。24時間後、培養液5mLを、窒素源であるNH<sub>4</sub>Clのみ1/10濃度に調製したM9培地にリンゴ酸ナトリウム0.5%を含有した培地1Lに加え、同様に振とうして菌体にPHBを蓄積させた。48時間後、PHB蓄積菌体を遠心分離によって収穫し、蒸留水40mLに再懸濁して4等分した(各10mL)。これらを1から4まで番号をつけ、以下の処理を行なった。

【0034】1:対照:更に遠心分離後メタノールで洗浄し、凍結乾燥して秤量した後クロロホルムで60℃、24時間抽出操作を行ない、抽出液をろ過、濃縮後、メタノールで最沈殿させ、減圧乾燥して対照ポリマーを得た。

【0035】2: 31%過酸化水素水(三菱瓦斯化学社

製; JIS K-8230)を40mL添加し、80℃で1時間処理を行なった。

【0036】3: 懸濁液を蒸留水で50mLにメスアップし、フレンチプレス(大岳製作所社製:フレンチプレス5501)を行なった後、4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間遠心分離を行なった。その後更に蒸留水40mLを加え、4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間遠心分離を行って洗浄した。

【0037】4: 3と同様の操作を行なった後、沈殿部分を10mLの蒸留水に懸濁し、31%過酸化水素水を40mL添加し、80℃で1時間処理を行なった。

【0038】5: 3と同様の操作を行なった後、沈殿部分を10mLの蒸留水に懸濁し、5mLの次亜塩素酸ナトリウム溶液(キシダ化学社製:次亜塩素酸ナトリウム12%(有効塩素濃度5%以上)含有)を加えて、4℃で2時間処理を行なった。

【0039】番号2から4は、遠心分離(4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間)し、更に再度4℃に冷却した後蒸留水40mLを加え良く攪拌した後同条件で2回遠心分離し、沈殿物を凍結乾燥して秤量した。

【0040】以下に示す「回収率」及び「純度」を評価する為、次の操作を行なった。

【0041】凍結乾燥した1から5までの試料にクロロホルム30mLを加え、60℃で24時間攪拌抽出操作を行なった。PHBが抽出されたクロロホルム溶液を0.45μmのPTFEフィルターでろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮して10倍量のメタノールに注加しPHBを沈殿、回収した。これらを減圧乾燥して秤量した。

【0042】対照である1に対する、2から5の試料のクロロホルム抽出によって得られたPHBの質量比を「回収率」とし、各試料の、クロロホルム抽出前の試料に対するクロロホルム抽出によって得られたPHBの質量比を「純度」として、表1に示す。

【0043】

【表1】

表1

	クロロホルム 抽出前重量 (mg/L)	クロロホルム 抽出後重量 (mg/L)	回収率 (%)	純度 (%)
1	2900	1830	-	-
2	1940	1790	97.8	92.3
3	2020	1810	98.9	89.6
4	1800	1760	96.2	97.8
5	1830	1770	96.7	96.7

【0044】回収率はそれほど変わらず、純度はフレンチプレス処理とその後の過酸化水素処理を行なった試料(4)及び次亜塩素酸処理を行なった試料(5)が良好であった。

【0045】得られたPHBは、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム:ポリマーラボラトリーPLgelMIXED-C(5 $\mu$ m)、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)により分子量を測定した。結果を表2に示す。

【0046】

【表2】

表2

	Mn	Mw	Mw/Mn
1	550000	1250000	2.3
2	510000	1230000	2.4
3	540000	1200000	2.2
4	500000	1210000	2.4
5	490000	1230000	2.5

【0047】各試料の分子量の差は殆ど見受けられなかった。

【0048】[実施例2] n-ノナン酸 0.1%を含有するM9寒天培地上のシュードモナス・オレオバランスのコロニーを、n-ノナン酸 0.3%を含有するM9培地 50mLに植菌し、30℃で振とう培養した。40時間後、培養液5mLをn-ノナン酸 0.1%及び5-フェニル吉草酸 0.1%を含有するM9培地1Lに加え、振とう培養した。更に40時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、窒素源であるNH<sub>4</sub>Clを含まず、n-ノナン酸 0.1%及び5-フェニル吉草酸 0.1%を含有するM9培地1Lに再懸濁し、同様に振とうして菌体に3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシ吉草酸、及び3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸をユニットとして含むPHAを蓄積させた。40時間後、PHA蓄積菌体を遠心分離によって収穫し、以下の処理を行なった。

【0049】6:対照:更に遠心分離後メタノールで洗浄し、凍結乾燥して秤量した後クロロホルムで60℃、24時間抽出操作を行ない、抽出液をろ過、濃縮後、メタノールで最沈殿させ、減圧乾燥して対照ポリマーを得た。

【0050】7: 31%過酸化水素水(三菱瓦斯化学社製; JIS K-8230)を40mL添加し、80℃で1時間処理を行った。

【0051】8: 懸濁液を蒸留水で50mLにメスアップし、フレンチプレス(大岳製作所社製:フレンチプレス 5501)を行った後、4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間遠心分離を行った。その後更に蒸留水40mLを加え、4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間遠心分離を行って洗浄した。

【0052】9: 3と同様の操作を行った後、沈殿部分を10mLの蒸留水に懸濁し、31%過酸化水素水を4

0mL添加し、80℃で1時間処理を行った。

【0053】番号7から9は、遠心分離(4℃、29400m/s<sup>2</sup>(3000G)で30分間)し、更に再度後蒸留水40mLを加え良く攪拌した後同条件で2回遠心分離し、沈殿物を凍結乾燥して秤量した。

【0054】これらの試料を実施例1と同様にクロロホルム抽出し、回収率及び純度を求めた。結果を表3に示す。

【0055】

10 【表3】

表3

	クロロホルム 抽出前重量 (mg/L)	クロロホルム 抽出後重量 (mg/L)	回収率 (%)	純度 (%)
6	1980	1080	-	-
7	1210	1000	92.6	83.4
8	1230	1010	93.5	82.1
9	1110	990	91.7	89.2

【0056】回収率はそれほど変わらず、純度はフレンチプレス処理とその後の過酸化水素処理を行った試料(9)が最も良好であった。

【0057】得られたPHBは、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム:ポリマーラボラトリーPLgelMIXED-C(5 $\mu$ m)、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)により分子量を測定した。結果を表4に示す

30 【0058】

【表4】

表4

	Mn	Mw	Mw/Mn
6	35000	91000	2.6
7	32000	89000	2.8
8	34000	90000	2.6
9	30000	89000	3.0

40 【0059】各試料の分子量の差は殆ど見受けられなかった。

【0060】

【発明の効果】本発明の方法により、微生物等の生体細胞内に蓄積されたポリヒドロキシアルカン酸を、簡便な方法で、且つ本来の分子量をほぼ保ったままで、高い回収率で回収することが可能となった。

## フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 智博  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
(72)発明者 本間 務  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
(72)発明者 野本 毅  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 須川 悦子  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
(72)発明者 矢野 哲哉  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
Fターム(参考) 4B064 AD83 CA01 CA02 CE02 CE20  
DA01 DA16